

Cited Reference #1 - English  
PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Abstract

(11)Publication number : 03-187386

(43)Date of publication of application : 15.08.1991

(51)Int.Cl.

C12P 7/62

A61K 47/34

A61L 17/00

A61L 31/00

C08G 63/06

C12N 1/20

// (C12P 7/62

C12R 1:05 )

(C12P 7/62

C12R 1:38 )

(C12P 7/62

C12R 1:02 )

(C12P 7/62

C12R 1:365 )

(C12P 7/62

C12R 1:04 )

(C12P 7/62

C12R 1:07 )

(C12P 7/62

C12R 1:065 )

(C12P 7/62

C12R 1:01 )

(C12N 1/20

C12R 1:05 )



(C12N 1/20

C12R 1:38 )

(C12N 1/20

C12R 1:02 )

(C12N 1/20

C12R 1:365 )

(C12N 1/20

C12R 1:04 )

(C12N 1/20

C12R 1:07 )

(C12N 1/20

C12R 1:065 )

(C12N 1/20

C12R 1:01 )

---

(21)Application number : 02-305892

(22)Date of filing : 09.11.1990

(71)Applicant : BOEHRINGER INGELHEIM KG

(72)Inventor : STEINBUECHEL ALEXANDER DR  
H TIMM ARNULF  
SCHLEGEL HANS-GUENTHER  
VALENTIN HENRY

---

(30)Priority

Priority number : 89 3937649 Priority date : 11.11.1989 Priority country : DE

---

**(54) POLYESTER CONTAINING 4-HYDROXYALKANOIC ACID AS RECURRING UNIT AND ITS PRODUCTION**

**(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To produce the subject polyester, useful as a suture material, etc., for surgical operation and having the chemically determined structure by growing a specific microorganism in the presence of a 4-hydroxyalkanoic acid.

**CONSTITUTION:** The pure culture of a microorganism of the genus *Alcaligenes*, etc., and its mutant strain is carried out and the resultant cultured product is then inoculated into a culture medium containing a 4-hydroxyalkanoic acid (preferably a 4-hydroxyalkanoic acid having a 4-6C chain length, more preferably 4-hydroxybutanoic acid) and proliferated by a batch type culture. The microbial cell is further collected by centrifugation and washed with a phosphate buffer solution (preferably a sodium phosphate buffer substance at pH 7.0), freeze-dried, etc., and extracted with chloroform, etc., to afford the objective polyester having  $\geq 40$  mol.% recurring unit of the 4-hydroxyalkanoic acid.



# cited Reference #エ

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-187386

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

③ 公開 平成3年(1991)8月15日

C 12 P 7/62  
A 61 K 47/34

B 8114-4B  
D 7624-4C  
7624-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 22 (全9頁)

④ 発明の名称 4-ヒドロキシアリカン酸を繰り返し単位とするポリエステル及びその製造方法

⑪ 特 願 平2-305892

⑫ 出 願 平2(1990)11月9日

優先権主張 ⑬ 1989年11月11日 ⑭ 西ドイツ(DE) ⑮ P3937649.4

⑦ 発 明 者 アレクサンダー シュ ドイツ連邦共和国 デー3400 ゲツティンゲン シュトウ  
タインビュツヒエル ンブフェ アイヒエ 44アー

⑧ 出 願 人 ベーリンガー インゲ ドイツ連邦共和国 6507 インゲルハイム アム ライン  
ルハイム コマンディ (番地なし)  
ットゲゼルシャフト

⑯ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外8名  
最終頁に続く

## 明 細 書

1. 発明の名称 4-ヒドロキシアリカン酸を繰り返し単位とするポリエステル及びその製造方法

### 2. 特許請求の範囲

(1) 4-ヒドロキシアリカン酸を繰り返し単位とするポリエステル。

(2) 異性体を含まないポリエステルであることを特徴とする、請求項(1)記載のポリエステル。

(3) 4-ヒドロキシアリカン酸の繰り返し単位が40モル%を越えることを特徴とする、請求項(1)記載のポリエステル。

(4) 4-ヒドロキシアリカン酸の炭素数が4~6であることを特徴とする、請求項(1)~(3)記載のポリエステル。

(5) 4-ヒドロキシアリカン酸が4-ヒドロキシブタン酸であることを特徴とする、請求項(1)~(4)記載のポリエステル。

(6) 3-ヒドロキシブタン酸単位、3-ヒドロキシバレリン酸単位及び4-ヒドロキシバレリン

酸単位からなることを特徴とする、請求項(1)記載のポリエステル。

(7) 3-ヒドロキシブタン酸単位を15モル%以上、3-ヒドロキシバレリン酸単位を40モル%以上、4-ヒドロキシバレリン酸単位を1モル%以上含むことを特徴とする、請求項(8)記載のポリエステル。

(8) 微生物を使用する、請求項(1)~(7)のいずれか1項に記載のポリエステルの製造方法。

(9) 微生物が土壌微生物であることを特徴とする、請求項(8)記載の方法。

(10) 微生物がアルカリゲネス属、シュードモナス属、アセトバクター属、ノカルジア属、アクチノミセス属、バチルス属、アゾトバクター属、アクアスピリラム属、ロードスピリラム属及びパラコッカス属から選ばれた微生物であることを特徴とする、請求項(9)記載の方法。

(11) 微生物が突然変異株であることを特徴とする、請求項(8)~(10)のいずれか1項に記載の方法。

(12) 微生物またはその微生物から得られる突然変

- 異株を4-ヒドロキシアルカン酸の存在下で成長させ、蓄積し、または培養し、次いでその細胞を採取した後、請求項(1)～(7)のポリエステルを得ることを特徴とする、請求項(8)～(11)のいずれか1項に記載の方法。
- (13) 微生物またはその微生物から得られる突然変異株をまず複合培地で成長させ、その後該株を4-ヒドロキシアルカン酸の存在下無機塩培地で培養し、そしてその細胞を採取した後、ポリエステルを得ることを特徴とする、請求項(8)～(11)のいずれか1項に記載の方法。
- (14) 無機塩培地が塩化アンモニウムを含有しないことを特徴とする、請求項(13)記載の方法。
- (15) 請求項(8)～(14)記載の方法によって製造することができるポリエステル。
- (16) 請求項(1)～(3)記載のポリエステルを製造するための請求項(8)～(11)のいずれか1項に記載の微生物の使用方法。
- (17) 請求項(1)～(7)記載のポリエステルを製造するための微生物。
- (18) 土壌微生物であることを特徴とする、請求項(17)記載の微生物。
- (19) アルカリゲネス属、シュードモナス属、アセトバクター属、ノカルジア属、アクチノミセス属、バチルス属、アゾトバクター属、アクアスピリラム属、ロードスピリラム属及びバラコッカス属から選ばれたものであることを特徴とする、請求項(18)記載の微生物。
- (20) 1989年11月3日に寄託したアルカリゲネス ユートローファス株 JMP222、DSM5630 から得られた突然変異株 SK2813。
- (21) 請求項(1)～(7)記載のポリエステルを外科、医薬の分野におけるカプセル化剤、マイクロカプセル化剤、及び活性物質として、並びに分解性パッケージ、物体、及び成形品の製造のために使用する方法。
- (22) 請求項(1)～(7)記載のポリエステルからなる成形品。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 〔産業上の利用分野〕

本発明は、4-ヒドロキシアルカン酸を繰り返し単位とするポリエステル及びその製造方法と使用方法に関する。

更に詳しくは、本発明は、炭素数4～6の4-ヒドロキシアルカン酸を主要な繰り返し単位とするポリエステルに関し、特に4-ヒドロキシブタン酸を主要な繰り返し単位とするポリエステルが好ましいものである。

#### 〔従来の技術〕

特定のバクテリアが、細胞内で3-ヒドロキシブタン酸残基からポリエステルを蓄積(concentrating)する能力を有することが知られている。そのようなポリエステルは、必然的に好気性微生物または土壌微生物の細胞内において特に粒体として存在する。このようなポリエステル類は、基本的にはD-(-)- $\beta$ -ヒドロキシブタン酸のポリマーとして存在している(ダウエス(Dawes)ら、Arch. Microbiol. Physiol. 14, 203-266, 1973)。

生分解性ポリエステル類は、従来から知られており、飽和脂肪族ヒドロキシモノカルボン酸(アルカン酸)から微生物学的方法で得られ、それらはアルカリゲネス ユートローファス(Alcaligenes eutrophus)の作用により得ることができるものであるが、3-ヒドロキシブタン酸(3HB)及び4-ヒドロキシブタン酸(4HB)の両方を種々の割合でランダムに含む(クニオカら(Kunioka et al.), Appl. Microbiol. Biotechnol. 30(6), 569-573, 1989)か、または、2種の異なる3-ヒドロキシアルカン酸類の偶然混合物を含む共重合体からなるものである(DE-OS 3,811,231、EP-A 288,908)。

これまで、4-ヒドロキシアルカン酸から異性体に関して純粋なポリエステルの合成法は知られていない。

生体内吸収性ポリエステルは、現在、医療の分野で注目されている。分解して無毒性物質になるポリマーについて多様な利用方法に照らして、その化学的構造が正確に決定されている生体内吸収

性ポリエステルに対する興味は益々高まっているのである。

〔発明が解決すべき課題〕

本発明の目的は、4-ヒドロキシアルカン酸を繰り返し単位とし、その化学的構造が決定されているポリエステルを製造することにある。

〔課題を解決するための手段〕

この課題の解決方法として、飽和脂肪族モノカルボン酸、好ましくは4-位に水酸基が置換した炭素数4～6の鎖長の飽和脂肪族モノカルボン酸、特に4-ヒドロキシブタン酸が、異性体に関して純粋であり、かつ、4-ヒドロキシアルカン酸の含有量が40%以上、60%以上、70%以上、または90%以上であることによって特徴づけられるポリエステルの製造出発原料として使用できること、及び一方ではその重合反応が、特定の微生物及びそれらから得られた突然変異株の作用によって進行するということが見出された。

4HBを炭素源として使用しても、4HBを0～37モル%の変動域で含む共重合ポリエステル

鎖長の4-ヒドロキシアルカン酸、更に好ましくは4-ヒドロキシブタン酸から、本発明によるポリエステルを製造することが可能であることが判った。もし、これら微生物が突然変異操作に付されたならば、これらポリエステルを縮合できる突然変異株は選択的に単離され得る。

従って、本発明は、対応する4-ヒドロキシブタン酸からポリ(4-ヒドロキシブタン酸)を合成する能力のある微生物に関するものでもあり、これら微生物の突然変異によって得ることができる微生物に関するものでもある。

本発明によれば、本発明によるポリエステルは以下の段階を含む工程によって製造され得る。

1. 4-ヒドロキシアルカン酸、好ましくは、炭素数4～6の鎖長の4-ヒドロキシアルカン酸、更に好ましくは4-ヒドロキシブタン酸からなるポリエステルを合成する能力を有する微生物からの純粋な培養物の蓄積(concentration)及び選別、またはそれらの突然変異株の純粋な培養物の調製。

類しか得られないという先行技術(クニオからの前掲文献)から、また他方ではポリ(3HB)を得ることを目的とした生合成法しか知られていないことから、この種のポリエステル合成法はこれまで知られておらず、また、予測されてもいなかった。それ故、異性体に関しても純粋であり、かつ、4-ヒドロキシアルカン酸の組成が40%以上である、4-ヒドロキシアルカン酸から得られるポリエステルの微生物による製造は、実施不可能であるとみられていた。

驚くべきことに、3HBに用いること及びそれをポリ(3HB)の形で蓄積することで知られており(例えば、ダウエスらの前掲文献)、また、4HBについて用いることができるが4HBを偶然比率(4HB、0～37モル%)で、それも限られた範囲内でしか含まない共重合体を生成することで知られている微生物を使用することによって、培養培地中のこれら微生物に適切な4-ヒドロキシアルカン酸が供給されたならば、対応する4-ヒドロキシアルカン酸、特に炭素数4～6の

2. 上記の4-ヒドロキシアルカン酸の一種を含む培養培地中でのバッチ法、連続バッチ法(fed-batch method)(バイオテクノロジーハンドブック(Handbuch der Biotechnologie)第2版プレフェ(Prave)ら著、1984年オルデンブルグ(Oldenburg)にて発行)、二段階法または連続法によるこれら微生物の純粋な培養物の培養。なお、かかる4-ヒドロキシアルカン酸は、対応するポリ(4-ヒドロキシアルカン酸)を蓄積する手段において、適宜塩の形で、例えば、ナトリウム塩またはカリウム塩の形で存在してもよい。

3. 本発明による微生物の細胞から生成したポリエステルの単離。

本発明によるポリエステルの製造に適した微生物は、公知の突然変異法及び蓄積法(アルゲマイン-ミクロビオロジー(Allgemeine Mikrobiologie)第6版シュレーゲル(Schlegel)著、1985年発行)によって得られるであろうものであり、更に4-ヒドロキシアルカン酸から対応するポリエス

テルを合成する能力のある全ての微生物、特に土壌微生物、好ましくは好気性土壌微生物、またはそれらの突然変異株を含む。ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)を合成し蓄積できることが知られているそれら微生物(ダウエスらの前掲文献)は、好ましい候補である。特に、アルカリゲネス(*Alcaligenes*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、アセトバクター(*Acetobacter*)属、ノカルジア(*Nocardia*)属、アクチノミセス(*Actinomyces*)属、バチルス(*Bacillus*)属、アゾトバクター(*Azotobacter*)属、アクアスピリラム(*Aquaspirillum*)属、ロードスピリラム(*Rhodospirillum*)及びパラコッカス(*Paracoccus*)属に属する微生物及びその微生物から調製される突然変異株が好ましい。そのうちのアルカリゲネス属及びシュードモナス属が、本発明によるポリエステル調製の出発株として特に好ましいのであり、広く知られた文献にも記載されている(バーゲイの分類書(*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*)バルチモア/ロンドン版クリーク(Krieg)ら

して選択することができる。

しかし、突然変異株の単離は、パーコール(Percol)密度勾配法で、例えば、シュベルトラ(Schubert et al.)による、*J. Bact.* 170, 5837-5847, 1988.に記載の方法に従って、遠心分離を行うならば、特に都合よくできることが明らかとなった。

本発明による微生物及びそれから得られる微生物は、例えば、EP-A 288,908 または前掲のシュベルトラの文献に記載されている公知の人造のまたは天然の炭素源(C-源)、公知の窒素源、無機物及び微量元素を含む通常用いられる完全培地中で培養できる。

驚いたことに、新たに見出された微生物について、培養の第1段階の最中でさえも、培地中に対応する4-ヒドロキシアルカン酸のあるものを添加すると、本発明のポリエステルの合成及び蓄積が、微生物の細胞の増殖と同時に進行するということが見出された。この方法は、本発明に従ってポリエステルを蓄積するという目的の下に連続培

養、ウィリアムス&ウィルキンス1984年発行)。

微生物を蓄積(concentration)するためには、例えば、EP-A 288,908 に開示されているように、炭素源、無機塩及び微量元素よりなる公知の組成の培地中で20℃~40℃、好ましくは、30℃付近の温度でそれらをインキュベートするものであり、目的とするポリエステルに対応する4-ヒドロキシアルカン酸の存在下に行うのである。

本発明による微生物の突然変異株は、純粋な培養物として以下の操作、即ち、突然変異、蓄積、選別及び培養によって調製することができる。

突然変異を起こすため、対象となる微生物を、標準的な手順に従って公知の化学的または物理的突然変異開始剤で処理する。例えば、この目的のため、微生物の細胞をニトロソ-尿素またはメタンスルホン酸エチルの存在下でインキュベートするか、または高エネルギー放射線を照射する。

得られた突然変異株は、野性型細胞と同じ方法で蓄積される。

得られた突然変異株は、密度勾配遠心法を使用

養を行う能力を前適応細胞(pre-adapted cells)が既に有しており、その結果として、細胞の培養から本発明のポリエステル類の貯蔵への転換をより迅速に行い得る、という多くの利益をもたらすものである。

従来から行われてきた方法においては、その培地は必須の第2培養段階の途中に決定的なC-源、例えば、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)で補充されてきただけ(例えば、EP-A 288,908 参照)なので、本発明に従い、4-ヒドロキシアルカン酸の存在下で微生物を好都合に培養出来ることは、単独のC-源、または1又はそれ以上の他の公知のC-源と共に使用するもののいずれであっても、予期できるものではなかった。

本発明による微生物及びそれから得られる突然変異株の培養過程は、培養条件に依存するであろう。その条件は、主として温度、培地中の酸素濃度(好気性条件)、及び培地自体(C-源の量、無機塩、微量元素、pH)で左右される。本発明による微生物及びそれから得られる突然変異株



の培養条件には、本技術分野の熟練者に知られていない格別な条件を考慮に入れる必要はなく、例えば、EP-A 288,908 に記載された条件を適用することができる。

4-ヒドロキシアルカン酸の使用量は、特に微生物またはそれらから得られる突然変異株に依存する。とはいえ、培養液 1 ℓ 当たり 4-ヒドロキシアルカン酸 1 g の濃度である 0.1 % (wt/vol) から、100 g/ℓ の濃度である 10 % (wt/vol) の範囲の濃度、より好ましくは 0.2 % (wt/vol) ~ 5 % (wt/vol) の範囲の濃度を指標とすることができる。

細胞は、一般に対数増殖期が定常期に移行している間、好ましくは定常期において採取する。細胞は、1 回の培養後に培地から完全に回収されるか（バッチ法または連続バッチ法）、または連続培養の手段、例えば、遠心分離または濾過によって連続的に得ることができる。

採取された細胞は、例えば、水、更に好ましくはリン酸塩緩衝液、特に中性 (pH 7.0) のリン

酸ソーダ緩衝液で任意に洗浄してもよく、そのあと、凍結して凍結乾燥に付するか、または噴霧乾燥に付してもよい。

本発明によるポリエステルは、公知の方法、好ましくは、溶解または有機溶媒での抽出により回収され、特に、例えば、クロロホルムまたは塩化メチレン等の塩素化炭化水素による抽出が好ましい。

本発明で得られるポリエステルの固有粘度の範囲は、25℃、クロロホルム溶媒で測定した場合 0.1 ~ 1.0 dl/g、好ましくは 1 ~ 9 dl/g であり、また、分子量の範囲は 10,000 ~ 10,000,000、好ましくは 100,000 ~ 5,000,000 であるが、これらはいずれも培養条件及び使用される菌株の種類に依存する。

本発明によるポリエステルが熱可塑性樹脂である場合、処理が容易であり、かつ、多くの用途に使用することが可能である。それらは、例えば外科手術の分野において開口部を閉鎖する物品（例えば、縫合材料、クランプ等）を製造するのに使

用でき、また、骨の固定部材（例えば、固定ピン、固定板、固定ねじ、固定合せピン等）として、分離部材、充填材または被覆材（例えば、織物、不織布材、詰綿）として、医薬の分野（例えば、賦形剤、担体、徐放系製剤等）において、カプセル化剤、マイクロカプセル化剤及び活性物質（植物保存剤、肥料、調味料、食品添加物、着色料等）に、分解性パッケージ（例えば、フィルム、びん等の中空体、アンプル、つぼ、袋、箱、ケース等）の製造に、その他の物品（フィルム、繊維、フィラメント等）または生分解性であることが要求される日常品の製造に、及び他の化学物質の出発原料（シンドン(synthon)）として使用できる。

本発明によるポリエステルの用途には、一定の適切な固有粘度の範囲がある。例えば、ポリマー粉末のホットプレスまたは加圧溶融によって製造される、例えば骨合成のために用いる外科的インプラントの製造には、2 ~ 1.0 dl/g、好ましくは 5 ~ 1.0 dl/g の固有粘度が適切であり、射出成形または押出成形によって製造される上記の如

きインプラントには、1 ~ 6 dl/g、好ましくは 2 ~ 4 dl/g が適切であり、活性成分の放出を妨害または制御した薬物製剤及びガレン処方剤の製造には、0.1 ~ 1.0 dl/g、好ましくは 0.2 ~ 2 dl/g が適切であり、例えば肥料や植物防腐剤等のコーティング等、農業の分野における用途には、0.1 ~ 1.0 dl/g、好ましくは 0.2 ~ 5 dl/g が適切であり、例えば分解性であることが要求されるフィルム、包装袋、日常品等の製造のための技術的用途には、0.3 ~ 6 dl/g、好ましくは 1 ~ 4 dl/g が適切である。

上掲の如き相違する目的に必要な粘度は、これまで説明した微生物的方法によってのみ得られるというのではなく、高分子量生成物を分解するという公知の方法によっても得られるものであることは、強調されるべきである。

以下の実施例は、本発明を説明したものであり、実施例に記載された方法は、理論的に他の微生物、特にアルカリゲネス属、シュードモナス属、アセトバクター属、ノカルジア属、アクチノミセス属、

バチルス属、アゾトバクター属、アクアスピリラム属、ロードスピリラム属、バラコッカス属、好ましくは、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)を合成及び縮合する能力を有するものとして知られている微生物(グウエスらの前掲文献)にも応用できるものであるということを強調するものである。

#### 実施例1

A. アルカリゲネス ユートローファス(*Alcaligenes eutrophus*)株 JMP222(DSM5630, ブダペスト条約に基づいて1989年11月3日に寄託)からの突然変異株 SK2813 の調製

50 mMの亜硝酸塩存在下、複合培地(Bにて特定したもの)中30℃で10日間インキュベートした後、0.5%のフルクトースを含む塩化アンモニウムを含まない無機塩培地(シュベルトらの前掲文献)に移して好気性条件下30℃で24時間インキュベートした。生成した細胞懸濁液から、前述(シュベルトらの前掲文献)のパーコール密度勾配法(150 mM食塩溶液、細胞懸濁液0.2 ml [細胞数約10<sup>8</sup>] 中、パーコール濃度75%

vol/vol [シグマケミカル社製])で遠心分離により目的とする突然変異株を単離した。得られた目的とする突然変異株は、上記の野性型細胞よりも低密度かつ多くの縞を有していた。各密度勾配ごとに分別し、その0.1 mlをMMフルクトースプレート上に0.005% (vol/vol) NH<sub>4</sub>Cl溶液と共に塗布した。目的とする突然変異株の各コロニーは、対応する野性型細胞のコロニーよりも透明性が優れているようであった。これらコロニーの一つを、突然変異株 SK 2813と命名し、更に先の工程で使用した。

#### B. 培養(バッチ式培養)

肉エキス(3 g)及びペプトン(5 g)からなる複合培地中、A段階において得られた突然変異株 SK 2813(50 ml、30℃、よく振った株)の前定常期株2 mlを脱イオン水1 l中に溶解し、以下の組成の無機塩培地50 mlに接種し、

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	9.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.02 g
Fe(III)NH <sub>4</sub> -クエン酸	0.0012 g

以下の組成の微量金属溶液10 mlを含む脱イオン水1 l中に溶解し、

#### チトリプレックスIII (Titriplex)

	500 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	20 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3 mg

4-ヒドロキシブタン酸(ナトリウム塩)の0.5% (wt/vol) 溶液を加えた脱イオン水1 l中に溶解し、好気性条件下、振盪フラスコ中で30℃で48時間培養した。

#### C. 得られたポリエステルの特性

B段階で得られたバクテリアを遠心分離により採取し、リン酸ソーダ緩衝液(pH 7.0)で洗浄したのち、凍結し凍結乾燥に付した。そして、ブランドルら(Brandl et al)の方法(Appl. Environ. Microbiol. 54, 1977-1982, 1988)に従って、得られた細胞をメタノリシスに付した。細胞内に蓄積したポリマーの量及び組成は、ヒドロキシアルカン酸のメチルエステルを対照物質として、ガスクロマトグラフィーで測定した(ブランドルらの前掲文献)。

得られたポリエステルの分析結果から、ポリエステルの量は、乾燥細胞に対し18.8重量%であった。このポリマーは、4-ヒドロキシブタン酸((4HB)モノマー)単位だけからなり、従って、ホモポリエステルであった。以下は固有粘度及び分子量の測定結果(2バッチ分)である。

[ $\eta$ ]	M <sub>w</sub>	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
4.54	759,200	149,300	5.09
3.54	579,400	183,700	3.15

[ $\eta$ ] : 固有粘度 (dl/g)

測定条件 クロロホルム溶液、25℃

M<sub>w</sub> : 重量平均分子量

測定方法 GPC法, 充填剤 Chloroform  
-High with ND-Polystyrol  
Standards (メルク社製)

M<sub>n</sub> : 数平均分子量

測定方法 M<sub>w</sub>と同じ

#### 実施例 2

突然変異株 SK2813 の代わりに野性型株アルカリゲネス ユートローファス JMP222 を使用した以外は、実施例 1 と同じ手順で実験を行った。

野性型株から得られたポリエステルの分析結果から、ポリエステルの量は、乾燥細胞に対し

21.5 重量%であった。このポリマーは、92.1%の 4HB と 7.9%の 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) からなっていた。

#### 実施例 3

突然変異株 SK2813 の代わりに野性型株シュードモナス sp. を使用した以外は、実施例 1 の B 及び C を繰り返した。

このシュードモナス突然変異株から得られたポリエステルの分析結果から、ポリエステルの量は、乾燥細胞に対し 18 重量%であった。このポリマーは、4HB だけからなり、従って、ホモポリエステルであった。

#### 実施例 4

この場合は、野性型株アルカリゲネス ユートローファス株 JMP222 を使用して 2 段階法により培養を行った。まず、第 1 段階において、好気性条件下、複合培地 (実施例 1 で特定したもの) 中 30℃ で 48 時間インキュベートした。

次に、第 2 段階で遠心分離によりこれら細胞を採取し、NH<sub>4</sub>Cl を含まない (実施例 1 と同様

の) 無機塩培地中に分散した。該培地には、4-ヒドロキシブタン酸 (2%, wt/vol) を補充した。窒素源がないため成長できないこの細胞を、好気性条件下 30℃ で 48 時間インキュベートした。遠心分離によりこれらバクテリアを採取し、リン酸ソーダ緩衝液 (pH) で洗浄したのち、凍結し凍結乾燥に付した。生成ポリマーの量及び組成は、実施例 1 と同様にして測定した。得られたポリマーの量は、乾燥細胞に対し 42 重量%であった。このコポリマーは、78.9%の 4HB と 21.1%の 3HB からなっていた。

#### 実施例 5

アルカリゲネス ユートローファス株 JMP222 (実施例 2) の代わりにアゾトバクター sp. DSM 1721 を使用した以外は、実施例 1 の B 及び C を繰り返した。

得られたポリマーの量は、乾燥細胞に対し 14.6 重量%であった。このコポリマーは、73.5%の 4HB と 26.5%の 3HB からなっていた。

#### 実施例 6

唯一の炭素源として 4-ヒドロキシバレリン酸 (4HV) を 0.1% (wt/vol) 含む実施例 1 の B と類似の無機酸塩培地 50 ml を、実施例 1 の B と類似の複合培地中の下記菌株の前培養物 10 ml とともに 300 ml 三角フラスコ中に接種した。これら菌株は、前述の菌株であり、入手可能なものである。

- (1) アルカリゲネス ユートローファス A7 (シュミット (Schmidt) ら, Appl. Environ. Microbiol., 44, 33-39, 1982) 、
- (2) アルカリゲネス ユートローファス CH 34 (マーギー (Mergeay) ら, Arch. Int. Physiol. Biochem. 86, 440-441, 1978) 、
- (3) アルカリゲネス ユートローファス JMP222 (ペンバートン (Pemperton) ら, In: Plasmids of medical and commercial importance [K. N. Timmis & A. Pühler, eds.] アムステルダムのエルゼビエル (Elsevier), 1979) 、
- (4) アルカリゲネス ユートローファス TF93 (ATCC 17697, DSM 531) 、

(5) アルカリゲネス キシロスオキシダンス ssp. ジナイトラフィカンス (*Alcaligenes xylosoxidans* ssp. *denitrificans*) (シュミット (Schmidt) ら, *FEMS Microbiol. Ecology*, **62**, 315-328, 1989) 、

(6) シュードモナス オキサラチカス (*Pseudomonas oxalaticus*) (DMS 1105)

これを 30℃ で振盪した。当初に添加した炭素源を消費し尽くしたあと、炭素源を 0.1% (wt/vol) の水準に維持するため 4HV を合計 4~5 回補充した後、実施例 1 の C と同様の操作で細胞の採取、洗浄、及び蓄積したポリエステル生成物の試験を行った。

これらバクテリアを使用して得られた 3 種類の単量体からなるポリエステルの分析結果は以下の通りである。

の 4 - ヒドロキシバレリン酸 (4HV) を含有する培地中 (同量) に移した。この培地中 30℃ で 48 時間細胞を攪拌した。この操作で得られた 3 種類の単量体からなるポリエステルの 4HV の割合は、一般に実施例 6 におけるよりも高く、その値は 8 モル% 以下であった。

菌株	乾燥細胞に対するポリマーの割合 (w/w%)	ポリマーの組成 (モル%)		
		3HB	3HV	4HV
(1)	16.4	29.3	67.2	3.4
(2)	45.0	15.0	82.2	2.7
(3)	17.3	36.0	58.8	5.5
(4)	31.0	32.6	63.9	3.5
(5)	33.7	16.1	80.8	3.1
(6)	32.5	31.9	65.8	2.4

3HV = 3 - ヒドロキシバレリン酸

#### 実施例 7

実施例 6 に挙げたバクテリアを実施例 1 の B の複合培地 50 ml 中で高い細胞密度で培養した後、これを実施例 1 の C で説明したように遠心分離して採取、洗浄した後、実施例 1 の B と類似の無機塩培地であるが塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl) を含まず唯一の炭素源として 0.5~2.0% (W/V)

## 第1頁の続き

⑤Int.Cl. <sup>5</sup>		識別記号	庁内整理番号
A 61 L	17/00	NLP	6971-4C
	31/00		6971-4C
C 08 G	63/06	A	6904-4J
C 12 N	1/20		7236-4B
/(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:05)		
(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:38)		
(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:02)		
(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:365)		
(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:04)		
(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:07)		
(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:065)		
(C 12 P	7/62		
C 12 R	1:01)		
(C 12 N	1/20		
C 12 R	1:05)		

⑫発明者	ハー アルヌルフ テ イム	ドイツ連邦共和国	デー3400	ゲッティンゲン	ローテ シュトラーセ 33
⑫発明者	ハンス ギュンテル シユレーゲル	ドイツ連邦共和国	デー3405	ボーヴエンデン	ゲルリッ ツエル シュトラーセ 35
⑫発明者	ヘンリー ヴアレンチ ン	ドイツ連邦共和国	デー3400	ゲッティンゲン	マルグエ リッテンヴェーク 6

